



OFICINA ESPAÑOLA DE  
PATENTES Y MARCAS

ESPAÑA



⑪ Número de publicación: **2 171 142**

⑫ Número de solicitud: 200003093

⑤① Int. Cl.<sup>7</sup>: C07D 311/32

A61K 31/352

⑫

PATENTE DE INVENCION

B1

⑫② Fecha de presentación: **22.12.2000**

⑫③ Fecha de publicación de la solicitud: **16.08.2002**

Fecha de concesión: **10.11.2003**

⑫⑤ Fecha de anuncio de la concesión: **16.12.2003**

⑫⑤ Fecha de publicación del folleto de patente:  
**16.12.2003**

⑦③ Titular/es: **CONSEJO SUPERIOR DE  
INVESTIGACIONES CIENTÍFICAS  
c/ Serrano, 117  
28006 Madrid, ES**

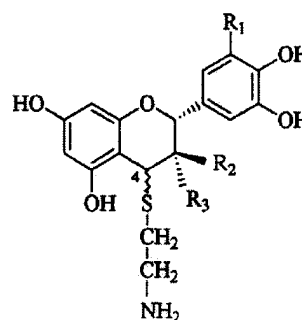
⑦② Inventor/es: **Torres Simón, Josep Lluís**

⑦④ Agente: **No consta**

⑤④ Título: **Conjugados de flavanoles y cisteamina.**

⑤⑦ Resumen:

Conjugados de flavanoles y cisteamina.  
La presente invención se refiere a nuevos productos que resultan de la conjugación de flavanoles con moléculas que contienen el grupo tiol. Las nuevas moléculas se obtienen a partir de extractos polifenólicos de plantas, los cuales son ricos en procianidinas y prodelphinidinas oligoméricas y poliméricas. De esta manera se generan nuevos productos con propiedades antioxidantes con aplicación como agentes protectores del organismo contra trastornos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro. La invención se refiere también la obtención de estos nuevos agentes a partir de materia prima residual proveniente de la industria agroalimentaria. Tales materias residuales son mezclas muy complejas, por lo cual se describe un método de aislamiento y purificación sencillo y eficaz, basado en las características físico-químicas de las nuevas moléculas.



Aviso: Se puede realizar consulta prevista por el art. 37.3.8 LP.

Venta de fascículos: Oficina Española de Patentes y Marcas. C/Panamá, 1 - 28036 Madrid

ES 2 171 142 B1

## DESCRIPCION

Conjugados de flavanoles y cisteamina.

## Sector de la técnica

La presente invención se refiere a nuevos productos que resultan de la conjugación de flavanoles con moléculas que contienen el grupo tiol. Las nuevas moléculas se obtienen a partir de extractos polifenólicos de plantas, los cuales son ricos en procianidinas y prodelfinidinas oligoméricas y poliméricas. De esta manera se generan nuevos productos con propiedades antioxidantes con aplicación como agentes protectores del organismo contra trastornos como el cáncer, enfermedades cardiovasculares y envejecimiento prematuro. La invención se refiere también la obtención de estos nuevos agentes a partir de materia prima residual proveniente de la industria agroalimentaria. Tales materias residuales son mezclas muy complejas, por lo cual se describe un método de aislamiento y purificación sencillo y eficaz, basado en las características físico-químicas de las nuevas moléculas.

## Antecedentes y estado de la técnica

Los flavanoles son miembros de una familia más amplia de compuestos llamados polifenoles. Estos contienen más de un grupo hidroxilo (OH) enlazado al correspondiente anillo bencénico. Los flavanoles oligoméricos incluyen las procianidinas y prodelfinidinas según presenten dos o tres grupos hidroxilo en el anillo B de la estructura flavanólica, respectivamente. La Figura 1 muestra la estructura general de las procianidinas y prodelfinidinas. Los polifenoles y, en particular, los flavanoles están presentes en todas las partes aéreas de las plantas y se encuentran en altas concentraciones en piel, corteza y semillas. Fuentes ricas en polifenoles son las hojas de te, piel/pepita de uva y corteza de pino. La acción antioxidante/antiradicalaria de los polifenoles los hace útiles como productos dedicados a la prevención de enfermedades y la promoción del estado de salud. Las células del cuerpo están expuestas constantemente a las llamadas especies reactivas oxidantes (ROS) tales como el peróxido de hidrógeno ( $H_2O_2$ ), anión superóxido ( $O_2^{\bullet-}$ ), radical hidroxilo ( $OH^{\bullet}$ ) y radicales peróxido ( $ROO^{\bullet}$ ), los cuales poseen potencial para causar daño celular. Por ejemplo, el deterioro del material genético (ADN) puede conducir a mutaciones y cáncer, y el deterioro de proteínas de la sangre (lipoproteínas de baja densidad, LDL) puede conducir a la acumulación de lípidos y consiguiente bloqueo de arterias. En la piel, la oxidación de lípidos de la pared celular está relacionada con cambios en la permeabilidad que causan sequedad y envejecimiento prematuro. La mayoría de ROS se producen en el curso de procesos biológicos ordinarios y el organismo evita sus efectos nocivos con sus propios mecanismos de defensa (p.e. superóxido dismutasa, catalasa y glutatión peroxidasa frente a anión superóxido, peróxido de hidrógeno y peróxidos orgánicos, respectivamente). Sin embargo, los sistemas de defensa no son perfectos y parte de las especies reactivas oxidantes pueden llegar a ellos. Además, algunas enfermedades, el envejecimiento, o factores externos como la contaminación ambiental, el tabaco y las radiaciones ultravioleta, pueden producir concentraciones de ROS que llegan a sobrepasar la capacidad de los mecanismos de defensa. En tales casos se requiere una acción suplementaria de tipo preventivo, mediante antioxidantes exógenos. Para información sobre ROS, daño oxidativo, mecanismos de defensa y la función de los polifenoles así como de otros antioxidantes, ver Diplock, A. T., Charleux, J. L., Crozier-Willi, G., Kok, F. J., Rice-Evans, C., Roberfroid, M., Stahl, W., Vina-Ribes, J., Br. J. Nutr., 80 Suppl 1, S77-112 (1998). Se han descrito extractos naturales de procianidinas con actividad antioxidante [Pietta, P., Simonetti, P., Mauri, P., J. Agr. Food Chem., 46(11), 4487-4490 (1998); Masquellier, J., US4698360; Frangi, E., Bertani, M., Mustich, G., Tuccini, G., US5484594, Nafsi-Movaghar, K., Seroy W. A., Svanoe, T. T., US5912363] y algunos de ellos se encuentran actualmente en el mercado.

Los polifenoles presentan también otras actividades interesantes, algunas de las cuales están relacionadas con sus propiedades adhesivas/antiadhesivas. Así, los polifenoles, en particular los flavanoles oligoméricos y los flavonoles glicosilados presentan actividad antimicrobiana, al menos en parte debida a la inhibición de la adhesión bacteriana [Walker, E. B., Mickelsen, R. A., Mickelsen, J., US5646178; Walker, E. B., Mickelsen, R. A., Mickelsen, J., US5650432; Hamada, S., Kontani, M., Hosono, H., Ono, H., Tanaka, T., Ooshima, T., Mitsunaga, T., Abe, I., FEMS Microbiol Lett., 143(1), 35-40 (1996)]. Los polifenoles y sus derivados son también utilizados en la industria de la alimentación como conservantes.

Gran parte de los extractos polifenólicos en el mercado son mezclas de muchas especies con diferente grado de polimerización. Se desconoce, para la mayoría de los productos, la manera como los diferentes componentes de las mezclas se absorben y distribuyen en los diferentes sistemas y tejidos biológicos. En muchos casos, parte de las moléculas activas se pierden, debido a su tendencia a la agregación consigo mismas o con proteínas, procesos que llevan a su desactivación, por ejemplo en la piel o en el sistema digestivo. Además, los investigadores encuentran que no sólo los polifenoles, en particular los oligoméricos,

tiene una actividad biológica general sino que diferentes fracciones o especies individuales de oligómeros poseen potenciales biológicos diferenciados. Debido a la similitud en sus propiedades físico-químicas, los compuestos individuales son difíciles de purificar. Además, normalmente, la cantidad de un determinado compuesto oligomérico en una mezcla compleja es baja.

5

La tioacidolisis de procianidinas y prodelphinidinas se usa para determinar el grado de polimerización de mezclas oligoméricas [Rigaud, J., Pérez-Ilzarbe, J., Ricardo da Silva, J. M., Cheynier, V., J. Chromatogr., 540, 401-405 (1991); Prieur, C., Rigaud, J., Cheynier, V., Moutounet, M., Phytochemistry., 36 (3), 781-784 (1994); Souquet, J.-M., Cheynier, V., Brossaud, F., Moutounet, M., Phytochemistry, 43 (2), 509-512 (1996), Souquet, J. M., Labarbe, B., LeGuerneve, C., Cheynier, V., Moutounet, M., J Agr Food Chem., 48(4), 1076-1080 (2000)]. Tolueno- $\alpha$ -tiol es utilizado como fuente de tioles. Los flavan-3-oles terminales se liberan como tales mientras que las unidades internas del polímero son liberadas en forma de benziltioéteres en la posición 4 del sistema flavanólico. Las mezclas son analizadas por cromatografía líquida de alta eficacia en fase reversa (reversed-phase high performance liquid chromatography, RP-HPLC). El método es útil desde el punto de vista analítico. No se han descrito aplicaciones para los derivados resultantes y, además, el posible producto de degradación, tolueno- $\alpha$ -tiol, es tóxico, irritante y lacrimógeno. El procedimiento de purificación se limita al uso de cromatografía en fase reversa.

Hay un ejemplo de cisteamina conjugada con una molécula antioxidante (tocoferol) [Pelle, E., Maes, D. H., US5811083]. La cisteamina se incorpora al tocoferol mediante un enlace amida y de esta forma se elimina la función amino. Además, el tocoferol es un tipo de compuesto diferente a los flavan-3-oles. Hay también ejemplos de compuestos antioxidantes obtenidos por incorporación de mercaptoctanol y de cadenas alquílicas a flavanoles [Tanaka, T., Kusano, R., Kouno, I., Bioorg Medicinal Chem Letter., 8(14), 1801-1806 (1998)]. Estos son derivados que no contienen el grupo amino y son de naturaleza anfifílica.

25

### Descripción de la invención

La presente invención describe una nueva combinación de una especie que contiene un grupo tiol y un grupo amino con especies que incluyen el sistema flavan-3-ol. También describe un método para obtener y purificar los nuevos productos. El tiol es cisteamina y la parte polifenólica consiste en diferentes monómeros que provienen de procianidinas y prodelphinidinas poliméricas. La Figura 2 muestra las estructuras de los nuevos conjugados. La fuente de polifenoles puede ser cualquier material vegetal que contenga procianidinas y/o prodelphinidinas cualquiera que sea el grado de polimerización de ellas. Un aspecto de la invención usa subproducto de prensado de uva como fuente de polifenoles poliméricos. Después de un simple paso de tioacidolisis las nuevas moléculas son eficazmente aisladas de la mezcla mediante un proceso de intercambio catiónico, gracias al grupo amino introducido con la cisteamina. Ulterior purificación por cromatografía en fase reversa produce cada uno de los compuestos activos. Los conjugados flavanólicos son secados a baja presión.

### Breve descripción de las figuras

Fig. 1. Estructuras de flavan-3-oles monoméricos y poliméricos. A: Flavan-3-oles monoméricos. B: Procianidinas y prodelphinidinas oligoméricas y poliméricas. Las flechas indican posibles posiciones de polimerización. Las moléculas enlazadas pueden ser flavanoles monoméricos u oligoméricos. Los enlaces se establecen entre el anillo tipo C central y cualquiera de las dos posiciones disponibles en los anillos de tipo A.

45

Fig. 2. Estructuras de los nuevos aminoetiltio derivados de flavan-3-oles.

Fig. 3. Eficacia antioxidante de los compuestos fenólicos en el ensayo de DPPH. La absorbancia (A) a 517 nm es una medida de la cantidad de radical libre que queda en solución.  $(1-A/A_0) \times 100$  representa el porcentaje de DPPH que ha reaccionado con el antioxidante. La cantidad de antioxidante se expresa como micromoles por micromol de DPPH• inicial para corregir la posible variabilidad día a día en la cantidad inicial de DPPH•. La concentración inicial de DPPH• se calcula a partir de su absorbancia (A) y una recta de calibrado. Cada punto representa la media de tres determinaciones.

55

□ Trolox

◇ Epicatequina

60

○ Aminoetiltioepicatequina I

△ Aminoetiltioepicatequina-3-      Q-galato III

## Descripción detallada de la invención

La presente invención describe la conjugación de polifenoles poliméricos con cisteamina para producir los productos I-VI. La fuente primera de flavanoles oligoméricos y poliméricos es tratada con agua/etanol para obtener la fracción polifenólica cruda. No es necesario efectuar posteriores fraccionamientos dado que la tioacidólisis funciona con el primer extracto. Tal cosa no excluye la utilización de otras fracciones de pureza variable obtenidas a partir del primer extracto o en el transcurso de cualquier otro proceso similar. En el curso de la presente invención los aminoetil derivados I-VI han sido generados a partir de fracciones del primer extracto. Después de eliminar el agua y disolventes de extracción, el residuo se suspende en metanol en presencia de ácido clorhídrico y la cantidad adecuada de cisteamina. La mezcla es calentada hasta 65°C y pasados 15 min, es enfriada y diluida con agua. Esta solución diluida se carga directamente en una columna de intercambio catiónico equilibrada a un pH ligeramente ácido. Los flavan-3-oles conjugados con cisteamina son retenidos por la resina mientras que el resto del material, es decir, flavan-3-oles monoméricos, otros polifenoles tales como flavonoles y ácidos fenólicos, y otras especies tales como azúcares, son eliminados en el lavado. Luego, los productos derivatizados son recuperados de la columna en presencia de la cantidad adecuada de sal (cloruro sódico) y disolvente orgánico de forma eficiente y sencilla. La mezcla resultante, que contiene una cantidad de productos mucho menor que el crudo de reacción, se somete a ulterior purificación mediante cromatografía líquida en fase reversa y subsiguiente liofilización, para obtener cada una de las nuevas moléculas con una pureza superior al 99.5 % por HPLC analítico.

Las nuevas moléculas son potentes antioxidantes con una excelente capacidad de capturar radicales libres. Los conjugados son más eficientes que Trolox (análogo de Vitamina E soluble en agua) en el ensayo del DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil) [Brand-Williams, W., Cuvelier, M. E., Berset, C., Lebensm.-Wis. u.-Technol., 28, 25-30 (1995)]. Los conjugados son también más eficientes que las correspondientes especies no derivatizadas.

El método de la presente invención comprende un número de fases que se presentan a continuación de forma separada para favorecer la claridad de la exposición.

### *Fase de extracción*

El primer paso en la preparación de los nuevos conjugados es la extracción de polifenoles a partir de la fuente primera vegetal. En una de las realizaciones de la invención los polifenoles son extraídos a partir del residuo de prensado de uva (piel, pepitas y lías) con agua/etanol (3:7) para dar un extracto crudo C. El mismo procedimiento puede usarse con otras fuentes tales como vainas, pieles/semillas de otras especies y hojas. Se pueden utilizar otros disolventes de extracción miscibles con agua tales como metanol y acetona. En otra de las realizaciones de la invención, el primer extracto crudo (C) se fracciona mediante reparto líquido/líquido usando etil acetato y agua acidificada con ácido acético. La mezcla se separa en dos capas, la orgánica (O, mayoritariamente acetato de etilo) y la acuosa (A, mayoritariamente agua). La fracción orgánica O contiene mayoritariamente flavan-3-oles monoméricos ((+)-catequina, (-)-epicatequina, (-)-epicatequin-3-O-galato), procianidinas y prodelfinidinas oligoméricas y flavonoles glicosilados. La fracción acuosa A contiene mayoritariamente procianidinas y prodelfinidinas de grado de polimerización elevado así como flavonoles y otras especies no flavonoicas como azúcares. Todos los crudos y fracciones son analizados/as por HPLC en fase reversa con elución mediante mezclas de agua y acetonitrilo en presencia de 0.1 % de ácido trifluoroacético con detección a 214, 280 y 320 nm.

### *Fase tiolisis*

El segundo paso es la tioacidólisis del primer extracto y las fracciones, según el caso. Varias de estas mezclas han sido usadas para la realización de la invención, a saber, el extracto etanólico crudo C, la fracción de acetato de etilo O y la fracción acuosa A obtenidas en la fase anterior. Es de un interés especial para la presente invención que los productos finales se pueden obtener eficientemente con independencia de la pureza de las fuentes de procianidinas/prodelfinidinas. Todas las mezclas de partida en esta fase son liofilizadas antes del tratamiento de hidrólisis. Se ha descrito que la reacción de tiolisis es completa en 10-15 min a 65°C en presencia de 0.2 M de ácido clorhídrico en metanol y un exceso de tiol de aproximadamente 1:50 (peso/peso). En la presente invención, se ha utilizado una razón de reactivos de solamente 1:5, con consumición de los polímeros iniciales en 15 min. No se ha detectado formación de antocianinas, como pone de manifiesto la ausencia de señales en el registro del cromatograma analítico de HPLC a 525 nm. Los conjugados mayoritarios en la mezcla resultante de la tiolisis son los tioésteres de epicatequina (I), epicatequingalato (III) y catequina (II), por orden de abundancia. Otros productos minoritarios son los derivados de epigallocatequina (IV), epigallocatequingalato (VI) y galocatequina (V).

La configuración de los compuestos en la posición 4 en el anillo C puede corresponder a cualquiera de las dos posibilidades ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ). En la Figura 2 la configuración en este carbono se expresa como  $4\xi$ .

#### *Aislamiento y purificación*

5

Un aspecto crucial de la presente invención es el aislamiento de los derivados de flavanoles a partir de mezclas de reacción complejas. En esta etapa es una ventaja importante haber introducido un grupo amina durante la formación de los conjugados. Los nuevos derivados son retenidos electrostáticamente a una resina de intercambio catiónico mientras que el resto del material se elimina en el lavado de la resina. Esta operación es importante porque permite el trabajo con primeros extractos sin posterior fraccionamiento. De poco sirve que éstos sean útiles en la fase o etapa anterior si la purificación posterior es inviable. El aislamiento de los nuevos productos puede ser realizado en presencia de gran cantidad de materiales de diferente naturaleza físico-química, los cuales, mientras no queden retenidos en la resina mediante una carga positiva, son eliminados fácilmente en el lavado. Ha de ser resaltado que una mayoría de posibles compuestos en las mezclas crudas es de naturaleza no iónica o aniónica (carga negativa en el pH de trabajo). La purificación de los componentes individuales a partir de la mezcla de tiolisis se facilita enormemente con este paso. Este proceso de lavado a través de resina presenta una gran eficacia que es independiente del extracto o fracción utilizado en las fases previas. La composición de las mezclas de tiolisis presenta algunas variaciones según sea el material de partida, siendo los productos mayoritarios esencialmente los mismos en todos los casos.

20

Diferentes resinas de intercambio catiónico pueden usarse en esta etapa de aislamiento o lavado. Las resinas incluyen preferentemente un grupo sulfónico incorporado a un soporte polimérico. Hay varios tipos de soporte que pueden ser utilizados en esta fase de la invención. Entre ellos se incluyen agarrasa, co-polímeros de estireno-divinilbenceno, polieter y metacrilato. Todas las resinas mencionadas son intercambiadores fuertes (el anión es un ácido fuerte). Sin embargo, las posibilidades no se limitan a estos soportes ni tampoco al anión intercambiador, que puede ser también, por ejemplo, un grupo carboxilo (ácido débil) incorporado a un soporte insoluble. Preferentemente, los conjugados se aíslan sobre intercambiadores fuertes SP Sepharose<sup>®</sup>, proporcionado por Amersham -Pharmacia Biotech y Macro-Prep HighS<sup>®</sup>, proporcionado por BioRad. Las resinas, empaquetadas en columna, son equilibradas con tampón de acetato sódico a pH 4.75 en presencia de una cantidad de disolvente soluble en agua, escogido entre metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano. Los crudos de tiolisis se cargan en la columna después de diluir la mezcla de reacción con agua (factor de dilución 115). Después la resina se lava con 10 volúmenes de columna del sistema de eluyentes tampón/disolvente de equilibrado. Los productos conjugados con cisteamina son eluidos de la resina de forma secuencial mediante tampones acetato que contienen cantidades apropiadas de disolvente y sal (NaCl). El procedimiento no solamente permite el aislamiento de los conjugados sino que también proporciona separación entre algunos de ellos, lo cual facilita aún más las siguientes operaciones de purificación.

35

Cada una de las especies químicas individuales se purifica extensivamente mediante HPLC preparativo en fase reversa, preferentemente en cartuchos de 25 x 5 cm empaquetados con fase estacionaria VYDAC<sup>®</sup> 18 proporcionada por The Separations Group. Las soluciones obtenidas después del lavado/aislamiento son diluidas con agua (factor de dilución 1/3) y cargadas separadamente en el cartucho, equilibrado previamente con tampón de fosfato de trietilamina pH 2.25. Cada componente es eluido de la columna mediante la cantidad apropiada de acetonitrilo en el tampón de equilibrado. Los productos puros son desalados posteriormente mediante recarga en el mismo cartucho y elución con agua/acetonitrilo en presencia de 0,1 % de ácido trifluoroacético. Las preparaciones finales se obtienen por liofilización.

45

#### *Ensayo de poder antioxidante/antiradicalario*

50

Los nuevos productos puros son potentes antioxidantes/captadores de radicales libres. La Figura 3 presenta los resultados del test de DPPH (1,1-difenil-2-picrilhidracil). Los valores de  $EC_{50}$  (concentración eficaz 50) se calculan a partir de las curvas.  $EC_{50}$  es la cantidad de antioxidante necesaria para hacer disminuir hasta la mitad la concentración inicial (alrededor de 60  $\mu$ M) de DPPH $\bullet$ . Esta cantidad se expresa como micromoles de antioxidante/micromoles de DPPH $\bullet$  inicial. Los valores de  $EC_{50}$  correspondientes a compuestos significativos para la presente invención son: Trolox (análogo soluble en agua de la Vitamina E), 0.26; (-)-epicatequina, 0.19, 4\xi-(2-aminoetiltio)epicatequina I, 0.11; 4\xi-(2-aminoetiltio)epicatequingalato III, 0.11. Según la definición de  $EC_{50}$  un compuesto es más efectivo cuanto más baja es la concentración eficaz.

55

60

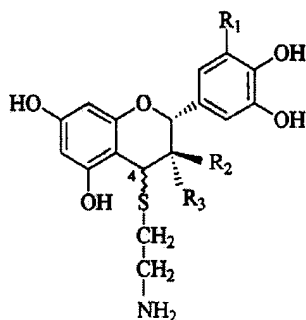
**Ejemplo**

En una realización de la presente invención, el compuesto I, 4ξ-(2-aminoetiltio)epicatequina se obtiene por tioacidolisis a partir de una fracción soluble en agua (A). La fracción A contiene una concentración de polifenoles de 10 g/L, medidos mediante el método de Folin-Ciocalteu y expresados como equivalentes en ácido gálico. Una alícuota de la fracción A (80 mL, 0.8 g equivalentes ácido gálico) se evapora al vacío y el residuo se suspende en metanol (80 mL). Luego se añade una solución de ácido clorhídrico (HCl) 37 % (1.72 mL) y cisteatnina (4 g) en metanol (80 mL) y la mezcla (160 mL) se mantiene a 65°C durante 20 min con agitación ocasional. Al final de la reacción se añade agua (640 mL) y la mezcla se guarda a 5°C.

El aislamiento de los aminoetiltioéteres de flavan-3-oles se consigue mediante intercambio catiónico en columna. La columna cromatográfica (1.6 x 10 cm, 20 mL de volumen de lecho), empaquetada con HighLoad SP Sepharose® se equilibra con tampón de acetato de sodio 20 mM, pH 4.75/acetonitrilo (CH<sub>3</sub>CN) (9:1). La mezcla (en alícuotas de 120 mL) se carga en la columna y el material no derivatizado, que no contiene el grupo amino, se eluye con 10 volúmenes de lecho (200 mL) del tampón de equilibrado. El compuesto 1 se eluye con un gradiente de sal (NaCl) (0 a 1 M) y un gradiente simultáneo de CH<sub>3</sub>CN (10 a 20 %) en 20 volúmenes de lecho (400 mL). El proceso cromatográfico se repite seis veces hasta agotar el total de la mezcla de tiolisis. Las fracciones se analizan por HPLC en fase reversa en una columna C18 y los eluyentes son mezclas de agua/CH<sub>3</sub>CN en presencia de 0.1 % de ácido trifluoroacético. Las fracciones que contienen el compuesto I se reúnen (650 mL para el total de las seis cargas) y se diluyen hasta 2.2 L con tampón de fosfato de trietilamina pH 2.25. La solución se carga en un cartucho preparativo empaquetado con VYDAC® C18 (fase reversa) y el compuesto I es eluido con un gradiente de CH<sub>3</sub>CN (0 a 12 %) en tampón fosfato de trietilamina pH 2.25 a lo largo de 60 min. El compuesto 4ξ-(2 -aminoetiltio)epicatequina 1 eluye a un valor de 5-6 % CH<sub>3</sub>CN. Las fracciones que contienen I se reúnen, se diluyen con agua y se desalan mediante un gradiente rápido de CH<sub>3</sub>CN en 0.1 % ácido trifluoroacético. La solución que resulta (300 mL) se liofiliza hasta que se consigue un sólido blanco (203 mg). La pureza del producto final es mayor de 99.5 % por HPLC analítico con detección a 215 nm. Mediante la técnica de la Espectroscopía de masas con ionización por electrospray se detecta un ión molecular de 366.3 unidades de masa, cuando el teórico para esta estructura es de 366.1. La estructura de 1 se confirma por desulfuración con Nickel Raney y comparación con un patrón de (-)-epicatequina. El producto final se caracteriza también por Resonancia Magnética Nuclear de protón (<sup>1</sup>H-NMR). Asignaciones (δ<sub>H</sub>) a 300 MHz en (CD<sub>3</sub>)<sub>2</sub>CO: 2.9-3.8 (4H, m, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); 4.02-4.07 (1H, 2m, 3-H); 4.08-4.18 (2H, m, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-NH<sub>2</sub>); 4.10-4.22 (1H, m, d J=2.1 Hz, 4-H); 5.12-5.23 (1H, 2s, 2-H), 5.89 (1H, d J=2.4 Hz, 6-H); 6.07-6.09 (1H, 2d, J=2.4 Hz cada uno, 8-H); 6.83 (2H, m, 5'-H, 6'-H); 7.10 (1H, d, J=2.1 Hz, 2'-H). Asignaciones (δ<sub>H</sub>) a 300 MHz en D<sub>2</sub>O: 2.64-3.26 (4H, 3m, S-CH<sub>2</sub>-CH<sub>2</sub>-N); 3.77 (1H, s ancho, 3-H); 3.91 (1H, s ancho, 4-H); 5.11 (1H, s ancho, 2-H); 5.84 (1H, d ancho, 6-H); 5.89 (1H, d ancho, 8-H); 6.72 (2H, s ancho, 5'-H, 6'-H); 6.82 (1H, s ancho, 2'-H). Algunas multiplicidades detectadas podrían ser debidas a la existencia de los dos productos con configuración 4α, 4β.

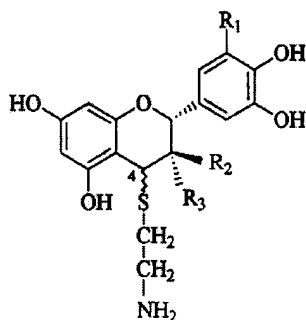
# REIVINDICACIONES

1. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura I,



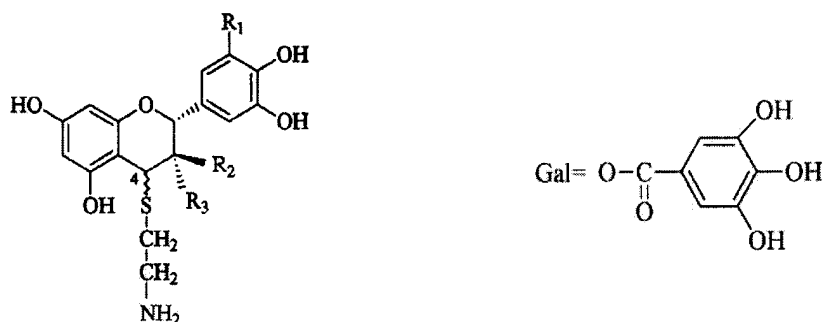
donde  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ , 4 $\xi$ -(2-aminoetiltio) epicatequina.

2. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura II



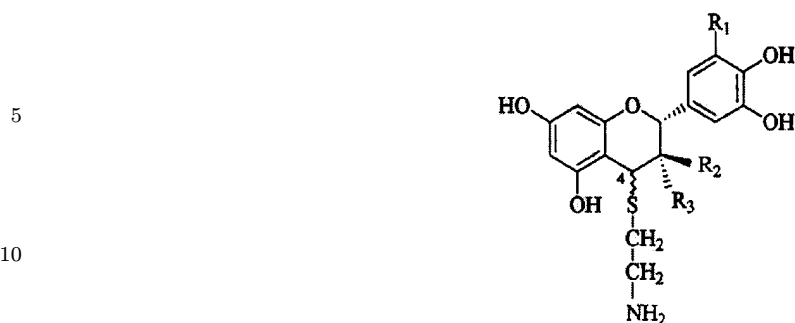
donde  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ , 4 $\xi$ -(2-aminoetiltio) catequina.

3. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura III



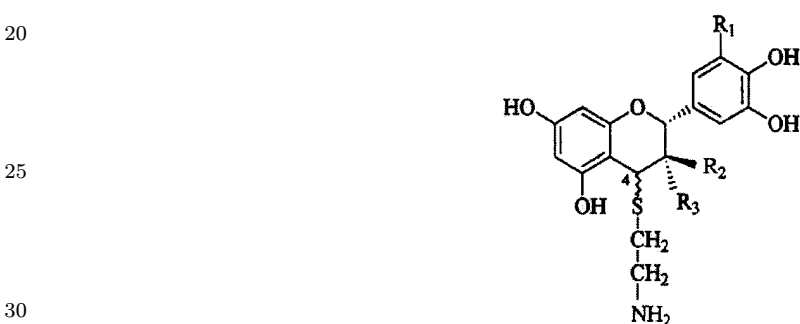
donde  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ , 4 $\xi$ -(2-aminoetiltio) epicatequina-3-O-galato.

4. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura IV



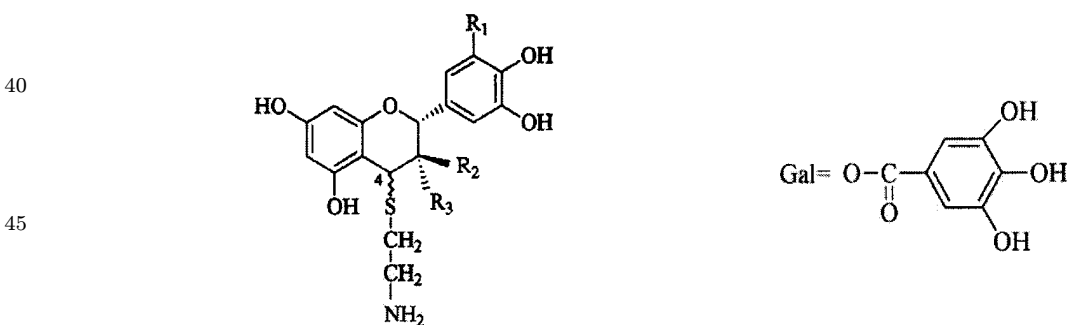
15 donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ , 4ξ-(2-aminoethylthio) epigallocatequina.

5. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura V.



donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ , 4ξ-(2-aminoethylthio) galocatequina.

6. Un compuesto o pareja de compuestos ( $4\alpha$ ,  $4\beta$ ) o cualquiera de sus sales **caracterizados** por la estructura VI.



50 donde  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ , 4ξ-(2-aminoethylthio) epigallocatequina-3-O-galato.

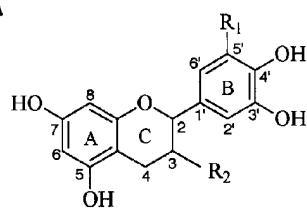
7. Procedimiento para preparación de los compuestos según reivindicaciones 1 a 6 **caracterizado** porque incluye el lavado y aislamiento de los compuestos activos mediante una resina de intercambio catiónico.

8. Procedimiento según reivindicación 7 porque utiliza mezclas de elución agua/sal/disolvente siendo el disolvente elegido entre metanol, etanol, acetonitrilo y tetrahidrofurano.

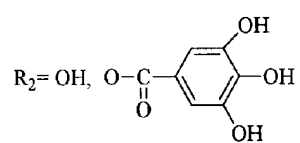
9. Aplicación de los compuestos de estructura I-VI que presentan actividad antioxidante/captadora de radicales libres en cosmética y/o farmacia como agentes de protección y prevención de enfermedades relacionadas con procesos de oxidación (cáncer, trastornos cardiovasculares) y envejecimiento prematuro.



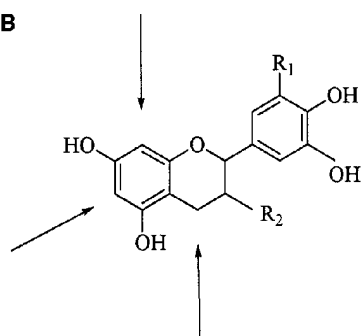
**A**



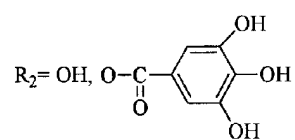
$R_1 = \text{H (catequinas), OH (galocatequinas)}$



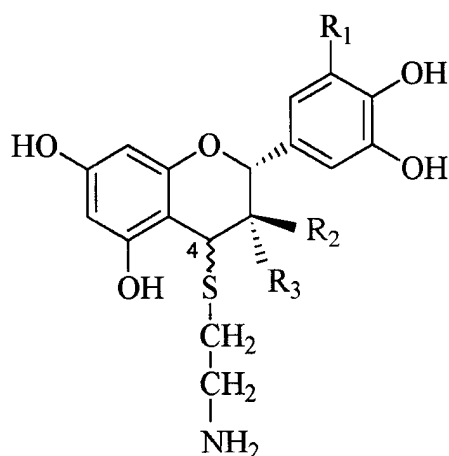
**B**



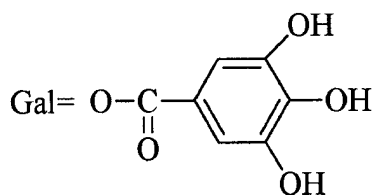
$R_1 = \text{H (procianidinas), OH (prodelphinidinas)}$



**Figura 1**



- I  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)epicatequina  
 II  $R_1=H$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)catequina  
 III  $R_1=H$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)epicatequina-3-O-galato  
 IV  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=OH$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)epigallocatequina  
 V  $R_1=OH$ ,  $R_2=OH$ ,  $R_3=H$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)gallocatequina  
 VI  $R_1=OH$ ,  $R_2=H$ ,  $R_3=Gal$ , 4ξ-(2-aminoethylthio)epigallocatequina-3-O-galato



**Figura 2**

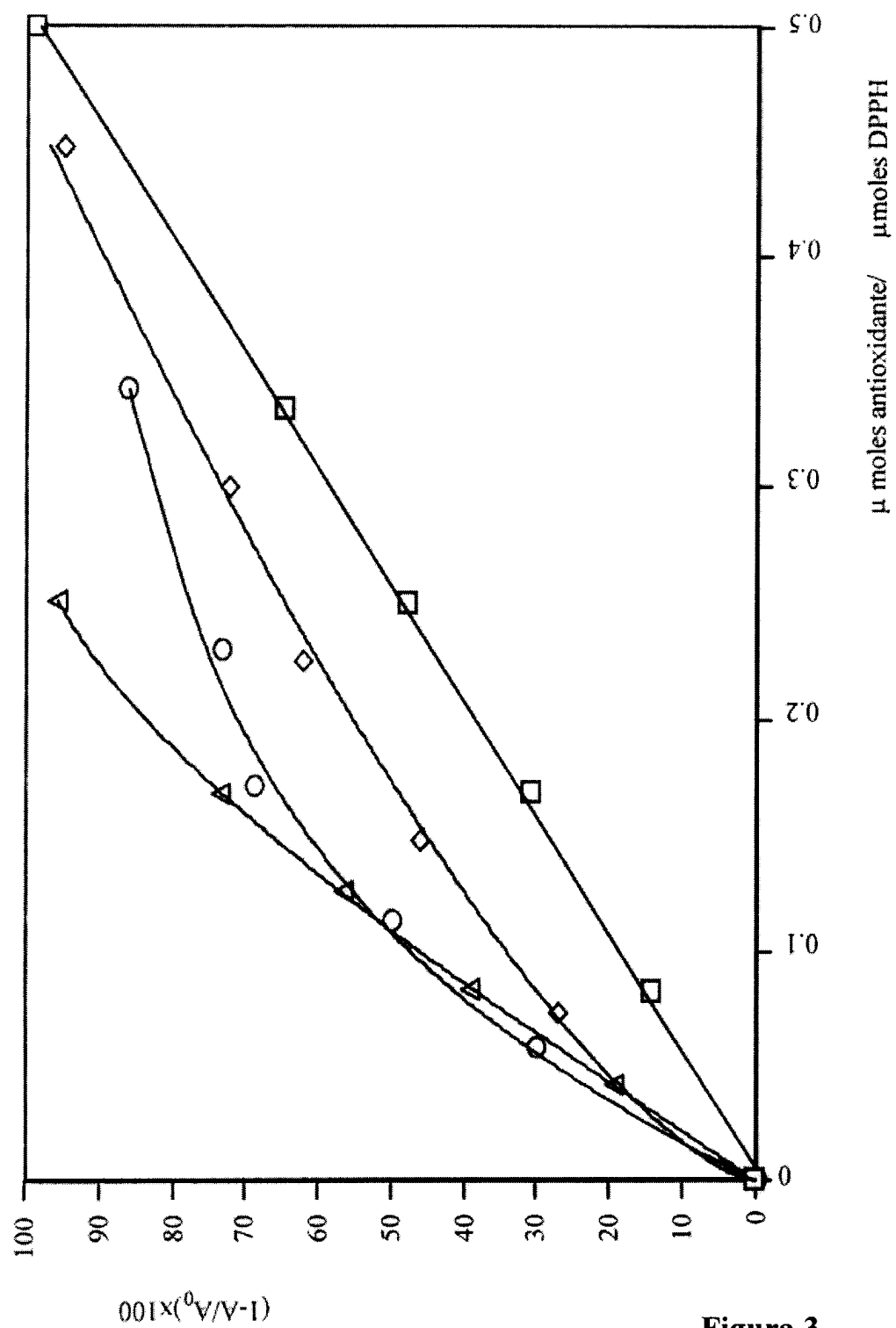


Figura 3



OFICINA ESPAÑOLA  
DE PATENTES Y MARCAS  
ESPAÑA

- ⑪ ES 2 171 142  
⑫ N.º solicitud: 200003093  
⑬ Fecha de presentación de la solicitud: 22.12.2000  
⑭ Fecha de prioridad:

## INFORME SOBRE EL ESTADO DE LA TÉCNICA

⑮ Int. Cl.<sup>7</sup>: C07D 311/32, A61K 31/352

### DOCUMENTOS RELEVANTES

Categoría	Documentos citados	Reivindicaciones afectadas
A	WIRTH, C. et WAGNER, H.: Pharmacologically active procyanidines from the bark of Uncaria tomentosa. Phytomedicine, 1997, Volumen 4, n.º 3, páginas 265-266. Todo el documento.	1-9
A	FACINO, R.M. et al.: Free radicals scavenging action and anti-enzyme activities of procyanidines from Vitis vinifera. Arzneim-Forsch. 1994. Volumen 44, n.º 5, páginas 592-601. Todo el documento.	1-9
A	JP 01-025726 A (YUUTOKU YAKUHIN KOGYO KK) (resumen) 27.01.1989. En: Patent Abstracts of Japan [CD-ROM]	1-9

#### Categoría de los documentos citados

X: de particular relevancia

Y: de particular relevancia combinado con otro/s de la misma categoría

A: refleja el estado de la técnica

O: referido a divulgación no escrita

P: publicado entre la fecha de prioridad y la de presentación de la solicitud

E: documento anterior, pero publicado después de la fecha de presentación de la solicitud

#### El presente informe ha sido realizado

☒ para todas las reivindicaciones

☐ para las reivindicaciones n.º:

Fecha de realización del informe  
15.02.2002

Examinador  
H. Aylagas Cancio

Página  
1/1